

Asimilación de Nitrógeno y Azufre

La importancia del nitrógeno para las plantas se acentúa por el hecho de que sólo carbono, hidrógeno y oxígeno abundan más en ellas. Aunque el nitrógeno se presenta en un gran número de constituyentes vegetales, la mayor parte se halla en proteínas. En plantas, la abundancia del azufre es de sólo 1/15 la del nitrógeno, pero se presenta en muchas moléculas, en especial en proteínas. Por lo común, ambos elementos se absorben del suelo en formas muy oxidadas y deben reducirse mediante procesos dependientes de energía antes de ser incorporados en proteínas y otros constituyentes celulares. Los sistemas metabólicos humanos son incapaces de duplicar esta reducción, de la misma manera que no pueden reducir CO_2 . La descripción de las formas en que los nitratos y sulfatos se reducen, y después se combinan con esqueletos de carbono para formar aminoácidos, es un objetivo importante de este capítulo. También se discutirá la fijación de N_2 atmosférico y las interconversiones de compuestos nitrogenados en diversos estadios del desarrollo vegetal. Blevins (1989) presenta un magnífico resumen de muchos aspectos relacionados con el metabolismo del nitrógeno.

14.1 Ciclo del Nitrógeno

En nuestro ambiente, el nitrógeno existe en varias formas. La continua interconversión de estas formas mediante procesos físicos y biológicos constituye el ciclo del nitrógeno, el cual se resume en la Fig. 14-1.

En la atmósfera existen grandes cantidades de nitrógeno (78% en volumen) aunque, en términos energéticos, resulta difícil para los seres vivos obtener en una forma utilizable los átomos de nitrógeno que hay en el N_2 . Aunque junto con el CO_2 el nitrógeno penetra

por los estomas a las células de las hojas, sólo hay enzimas para reducir el CO_2 , por lo que el N_2 sale con la misma rapidez con que entra. La mayor parte del nitrógeno llega a los seres vivos sólo después de su fijación (reducción) por microorganismos procariotes, algunos de los cuales se encuentran en las raíces de ciertas plantas, o mediante fijación industrial en la manufactura de los fertilizantes. Con la lluvia también se desplazan pequeñas cantidades de nitrógeno de la atmósfera al suelo, en forma de iones amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), que después son absorbidos por las raíces. Este NH_4^+ se origina en combustiones industriales, actividad volcánica e incendios forestales, mientras que el NO_3^- proviene de la oxidación de N_2 por el O_2 o el ozono en presencia de radiación ultravioleta o tormentas eléctricas. Los océanos son otra fuente de NO_3^- . Las capas blancas que el viento produce liberan diminutas gotas de agua llamadas aerosoles, de las que el agua se evapora dejando sales oceánicas suspendidas en la atmósfera. Cerca de las costas, estas sales pueden llegar a tierra con el agua de lluvia. Se les conoce como **sales cíclicas** debido a que más adelante regresan al océano con las corrientes de agua.

La absorción de NO_3^- y NH_4^+ que realizan los vegetales les permite formar numerosos compuestos nitrogenados, sobre todo proteínas. Estiércol y plantas, microorganismos y animales muertos en descomposición son importantes fuentes de nitrógeno que regresa al suelo, si bien la mayor parte de este nitrógeno es insoluble y no está disponible de inmediato para que lo utilicen las plantas. Casi todos los suelos contienen pequeñas cantidades de diversos aminoácidos, producidos principalmente por la descomposición microbiana de materia orgánica, pero también por excreciones de las raíces vivas. Aun cuando tales aminoácidos pueden ser absorbidos y metabolizados por las plantas, és-

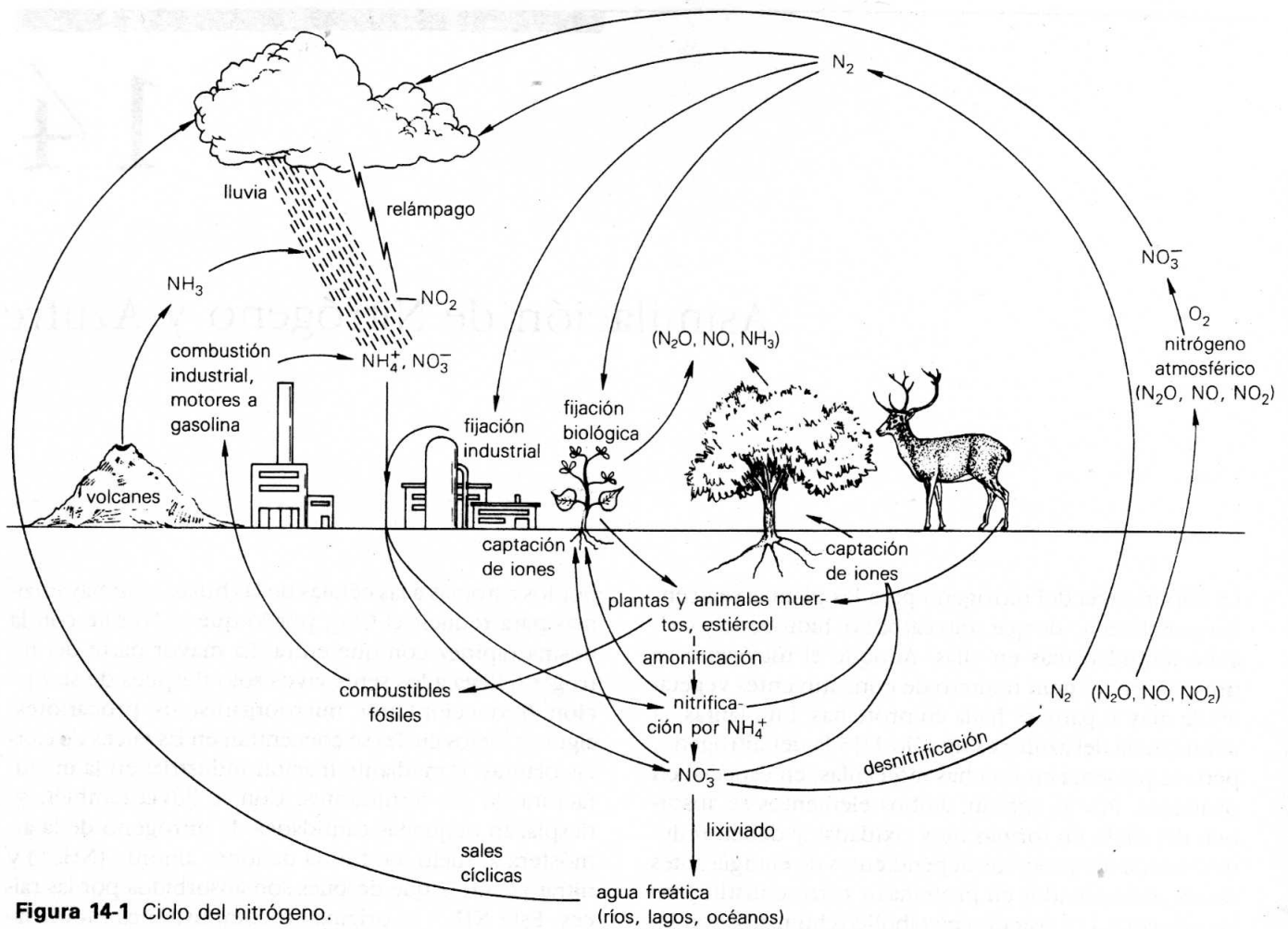


Figura 14-1 Ciclo del nitrógeno.

tos y otros compuestos nitrogenados más complejos contribuyen poco, de manera directa, a las necesidades de nitrógeno del vegetal. Sin embargo, tienen gran importancia como reservas de nitrógeno, ya que de ahí se pueden extraer NH_4^+ y NO_3^- . De hecho, hasta un 90% del nitrógeno total en los suelos puede estar en la materia orgánica, aunque en algunos casos existen cantidades significativas de NH_4^+ en coloides de arcillas.

La conversión de nitrógeno orgánico en NH_4^+ , por bacterias y hongos del suelo se conoce como **amonificación**. Este proceso puede ocurrir con muchos tipos de microorganismos, a temperaturas y a diversos valores de *pH*. Después, en suelos húmedos cálidos con *pH* casi neutro, el NH_4^+ es oxidado aún más por bacterias a nitrito (NO_2^+) y NO_3^- en unos pocos días tras su formación o adición como fertilizante. Esta oxidación, conocida como **nitrificación**, proporciona energía para la supervivencia y proliferación de los microbios mencionados, como lo hace la oxidación de alimentos más complejos para otros organismos. Las bacterias del género *Nitrosomas* son más importantes en la oxidación de amonio a nitrito, mientras que las bacterias del género *Nitrobacter* por lo común reducen la mayor par-

te del nitrito a nitrato. En muchos suelos fríos, ácidos o hipóxicos, sin embargo, las bacterias nitrificantes son menos eficaces y abundantes, por lo que el NH_4^+ viene a ser una fuente nitrogenada más importante que el NO_3^- . Esto es válido, por ejemplo, en suelos árticos y pantanos anaerobios. Muchos árboles de bosque absorben la mayor parte de su nitrógeno en forma de NH_4^+ debido al *pH* bajo, común en suelos forestales y, probablemente, a causa de que otros factores contribuyen a reducir las tasas de nitrificación. Debido a su carga positiva, el NH_4^+ se adsorbe a coloides del suelo, mientras que el NO_3^- no es adsorbido, por lo que se lixivia con mucho mayor facilidad.

También se pierde nitrato de los suelos por **desnitrificación**, el proceso por el cual bacterias anaerobias forman N_2 , NO , N_2O y NO_2 a partir de NO_3^+ . Estas bacterias utilizan NO_3^- en vez de O_2 como aceptor de electrones durante la respiración, con lo que obtienen energía para sobrevivir. La desnitrificación se presenta en el suelo a profundidades considerables (donde la penetración de O_2 es limitada), en suelos inundados o compactos y en ciertas regiones cercanas a la superficie del suelo donde la concentración de O_2 es baja porque se le utiliza con especial rapidez en la oxida-

ción de materia orgánica. Además, las plantas pierden en la atmósfera pequeñas cantidades de nitrógeno en forma de NH_3 , N_2O , NO_2 y NO , volátiles, sobre todo cuando se encuentran bien fertilizadas con nitrógeno (Wetselaar y Farquhar, 1980; Duxbury *et al.*, 1982). Las formas oxidadas de nitrógeno que hay en la atmósfera son importantes en términos ecológicos, porque cuando se convierten en NO_3^- , aportan HNO_3 a la precipitación pluvial ("lluvia ácida").

14.2 Fijación del Nitrógeno

El proceso por el que el N_2 se reduce a NH_4^+ se conoce como **fijación de nitrógeno** (lo cual es revisado por Dixon y Wheeler, 1986). Hasta donde se sabe, sólo lo realizan procariotes. Entre los fijadores de nitrógeno principales se encuentran ciertas bacterias de vida libre del suelo, cianobacterias de vida libre (algas verde-azules) en la superficie del agua o el suelo, cianobacterias en asociación simbiótica con hongos, en líquenes o con helechos, musgos y hepáticas (Peters, 1978; Peters y Meeks, 1989), y bacterias u otros microbios en simbiosis con raíces, en especial de leguminosas. Su cometido en la fijación de nitrógeno es de gran importancia para la cadena alimentaria en bosques, ambientes marinos y de agua dulce, e incluso en regiones árticas. Además, la actividad de las raíces de plantas fijadoras de nitrógeno beneficia a las raíces de plantas circundantes, ya sea por la excreción de nitrógeno en los nódulos o mediante la descomposición microbiana de nódulos y aún de plantas completas (Ta y Faris, 1987). Esta contribución es importante en la agricultura, en donde muchas veces se utilizan mezclas de leguminosas y pastos como pasturas.

Se ha estudiado la fijación de nitrógeno en alrededor del 15% de las casi 20 000 especies de la familia Fabaceae (Leguminosae), de las cuales como un 90% poseen nódulos radicales, que es en donde se realiza la fijación (Allen y Allen, 1981). Las especies importantes no leguminosas que fijan N_2 son árboles y arbustos de diversa taxonomía, ya que representan 23 géneros y ocho familias, incluyendo miembros de los géneros *Alnus* (aliso), *Myrica* (como *M. gale* el mirto de turbera), *Shepherdia*, *Coriaria*, *Hippophae*, *Eleagnus* (olivo), *Ceanothus* y *Casuarina* (Tjepkema *et al.*, 1986; Dawson, 1986). Estas plantas no leguminosas son plantas pioneras típicas en suelos con deficiencia de nitrógeno; por ejemplo, *M. gale* en suelos pantanosos del oeste de Escocia y *Casuarina equisetifolia* en dunas arenosas de islas tropicales. En la Fig. 14-2 se muestra el importante cometido de los nódulos radicales en *M. gale* para el aporte de nitrógeno. Todas las plantas que aparecen en esta figura tienen cinco meses de edad, pero sólo el grupo nodulado de la izquierda pudo crecer bien en la solución nutritiva carente de sales nitrogenadas.



Figura 14-2 Ejemplares de mirto de turbera (*Myrica gale*) cultivados con (izquierda) y sin (derecha) nódulos en una solución hidropónica carente de nitrógeno. Las plantas se cultivaron en la solución, a partir de la semilla, durante cinco meses. (Tomado de Bond, 1963.)

Existe interés considerable entre los dasónomos por seleccionar y reproducir árboles no leguminosos fijadores de nitrógeno susceptibles de plantarse junto con árboles de mayor importancia económica o antes de ellos. Uno de los objetivos de esto es reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados en la industria maderera. Ya se ha logrado cierto éxito utilizando poblaciones mixtas de pino Oregon y aliso rojo en el Noroeste de Estados Unidos. Hay diferentes especies de aliso que prometen para otras regiones templadas, y debe haber especies de otros géneros que sean eficaces en regiones tropicales (Dawson, 1986).

Se han identificado los microorganismos responsables de la fijación del nitrógeno en raíces de diversas especies. En algunos árboles tropicales se trata de varias cianobacterias, pero en la mayoría de los árboles o arbustos son actinomicetos (procariotes filamentosos) del género *Frankia* los que realizan este proceso. En leguminosas, los responsables son especies bacterianas de los géneros, muy relacionados entre sí, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Downie y Johnson, 1988; Djordjevic *et al.*, 1987; Quispel, 1988). Hay especies de *Rhizobium*, o semejantes a este género, que sólo son eficaces con una especie de leguminosa. Todos los rizobios son bacterias aerobias que subsisten en el suelo como saprofitas hasta que infectan un pelo radical (Fig. 14-3) o, en ocasiones, una célula epidérmica dañada. Por lo común, los pelos radicales responden a la invasión curvándose y rodeando a las bacterias; el enrollamiento de la raíz es causado por moléculas no identificadas que libera la bacteria. Otro hallazgo interesante es el hecho de que los genes de los rizobios que

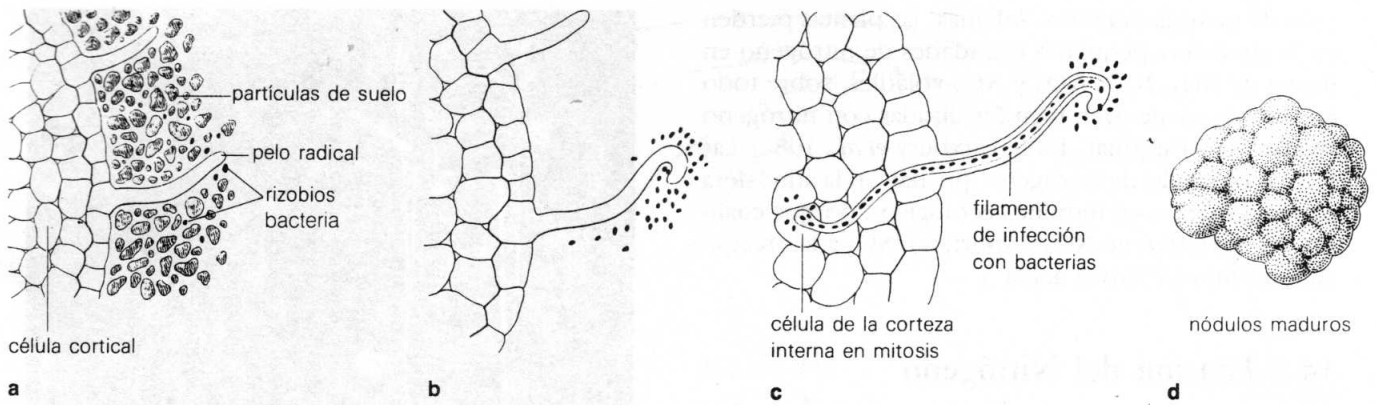
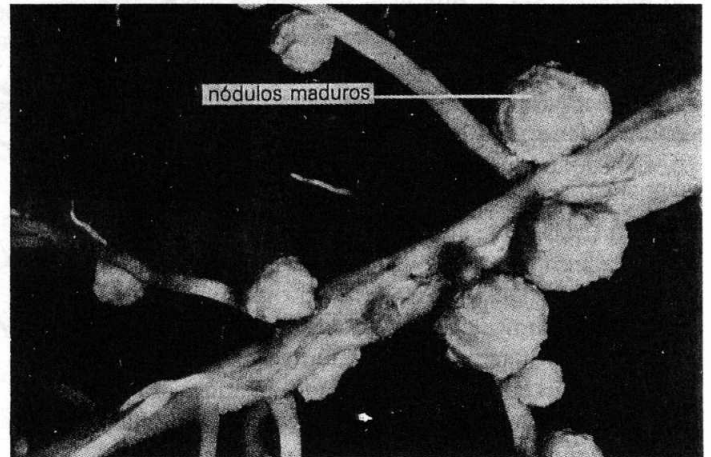


Figura 14-3 Desarrollo de nódulos radicales en la soja. (a) y (b) Bacterias del género *Rhizobium* entran en contacto con un pelo radical susceptible, se dividen en su cercanía y, al tener éxito la infección del pelo radical, hacen que éste se curve. (c) Filamento de infección con bacterias en división, ahora modificadas y evidentes como bacteroides. Los bacteroides hacen que se dividan las células corticales y del periciclo. La división y el crecimiento de células corticales y del periciclo dan lugar a **d** un nódulo maduro completo, con tejidos vasculares que se continúan con los de la raíz. Los tres nódulos mayores de la derecha tienen de 3 a 4 mm. (Micrografía en **d** de Bergersen y Goodchild, 1973.)



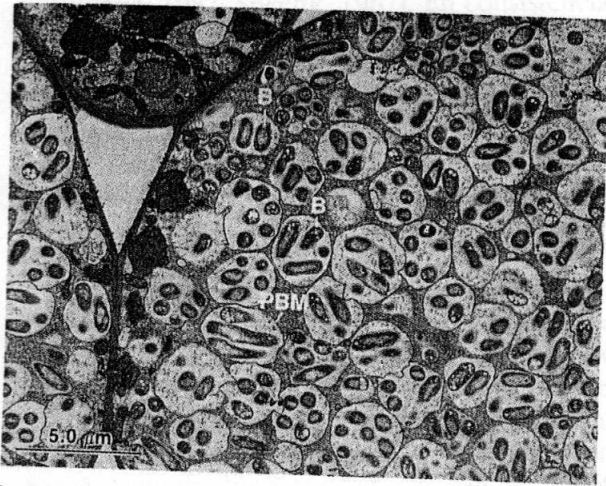
controlan la producción de las moléculas que causan el enrollamiento son activados en primera instancia por compuestos que liberan las raíces, quizá los pelos radicales. En alfalfa, trébol y haba, los compuestos que más abundan son ciertos flavonoides (los cuales se describen en la Secc. 15.7; Bothe, 1987; Maxwell *et al.*, 1989). Estos resultados resaltan el hecho de que tal vez los pelos radicales envían diversas señales químicas específicas que, de alguna manera, son reconocidas por las bacterias invasoras (Kondorosi y Kondorosi, 1986).

A continuación, las enzimas bacterianas degradan parte de la pared celular y permiten que las bacterias entren a las células del pelo radical. Entonces, el pelo radical produce una estructura filiforme llamada **filamento de infección** y que consiste en una extensión arrollada de membrana plasmática de la célula invadida, junto con celulosa nueva que se forma *dentro* de esta membrana. Las bacterias se multiplican abundantemente dentro del filamento, el cual avanza hacia el interior penetrando a través de las células corticales y entre ellas.

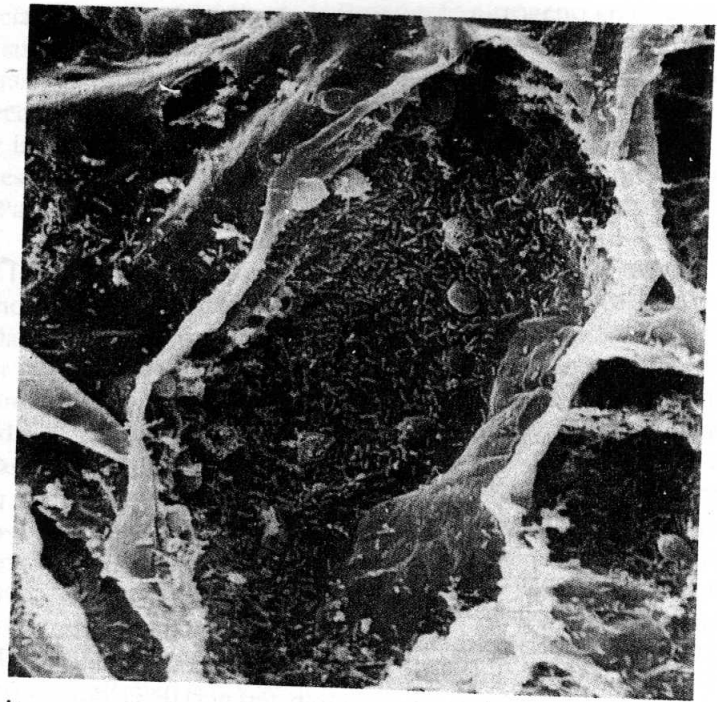
Las bacterias se liberan en el citoplasma de las células de la corteza interna y estimulan la división de algunas células (sobre todo tetraploides). Estas divisiones causan una proliferación de tejidos, con lo que se llega a formar un **nódulo radical** maduro (Fig. 14-3) conformado, en gran parte, por células tetraploides que contienen bacterias, así como por algunas células diploides

sin bacterias. Cada bacteria agrandada, carente de motilidad, se conoce como **bacterioide**. Una célula típica de nódulo radical contiene varios miles de bacteroides (Fig. 14-4). Por lo general los bacteroides se encuentran en el citoplasma en grupos, cada uno rodeado por una membrana celular denominada **membrana peribacterioidea**. Entre esta membrana y el grupo de bacteroides se encuentra una región que recibe el nombre de **espacio peribacterioideo**. Fuera de este espacio, en el citosol, se encuentra una proteína conocida como **leghemoglobina** (Apleby, 1984; Appleby *et al.*, 1988; Haaker, 1988; Powell y Gannon, 1988). Esta molécula es roja debido a un grupo hem (como en la hemoglobina de la sangre) que se encuentra unido como grupo prostético a la proteína incolora globina. La leghemoglobina da a los nódulos de leguminosa color rosa, el cual se encuentra mucho más diluido en nódulos de plantas no leguminosas. Se piensa que la leghemoglobina ayuda a llevar O_2 a los bacteroides a tasas muy controladas. Demasiado O_2 desactiva a la enzima que cataliza la fijación de nitrógeno, pero se necesita cierta cantidad de O_2 para la respiración del bacterioide.

La fijación de nitrógeno en nódulos radicales se efectúa directamente dentro de los bacteroides. La planta hospedante proporciona carbohidratos a los bacteroides, los cuales los oxidan para obtener energía. Estos carbohidratos se forman primero en las hojas, durante



a



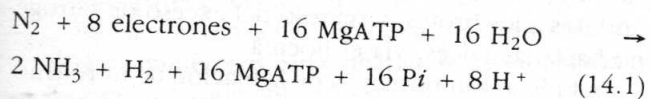
b

Figura 14-4 (a) Micrografía electrónica de transmisión de bacteroides en el interior de partes de tres nódulos radiculares de soja (*Glycine max*). Con frecuencia, numerosos bacteroides (B) se encuentran en grupos de cuatro a seis, cada grupo rodeado por un espacio peribacteroideo (región clara) y este último rodeado por una membrana peribacteroidea (PBM). Pueden apreciarse las paredes celulares de la planta, así como un espacio intercelular lleno de aire, arriba a la izquierda. (Tomado de D. A. Day, G. D. Price y M. K. Udvardi, 1989.) (b) Micrografía electrónica de transmisión que muestra cientos de bacteroides en una célula de un nódulo radical de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Los gránulos mayores, con forma de huevo, probablemente son gránulos de almidón. (Cortesía de P. Dayanandan.)

la fotosíntesis, y después se translocan hacia los nódulos radiculares a través del floema. La sacarosa es el carbohidrato que se transloca en mayor abundancia, al menos en leguminosas. Algunos de los electrones y ATP que se obtienen durante la oxidación que efectúan los bacteroides se utilizan para reducir N_2 a NH_4^+ .

Bioquímica y Fisiología de la Fijación de Nitrógeno

La reacción química global para la fijación de nitrógeno (reducción) se resume en la Ecuación 14.1:



Como puede apreciarse, el proceso requiere tanto una fuente de electrones y protones como numerosas moléculas de ATP. Además, parece ser obligatoria la producción de un H_2 por cada N_2 que se reduce (Haaker, 1988; Haaker y Klugkist, 1987). También se requiere un complejo enzimático denominado **nitrogenasa**, el cual cataliza la reducción de otros muchos sustratos, incluyendo acetileno, cianuro, azida, óxido de nitró-

geno e hidrazina. La reducción de acetileno a etileno se mide con frecuencia para estimar las tasas de fijación de nitrógeno en suelos, lagos y corrientes de agua, en parte debido a que resulta muy sencillo cuantificar el etileno con un cromatógrafo de gases.

La fuente original de electrones y protones es el carbohidrato que se transloca de las hojas (y que después las bacterias respiran). La respiración de carbohidrato por bacteroides causa la reducción de NAD^+ a $NADH^+$ o de $NADP^+$ a $NADPH$, como se describió en el Cap. 13. De manera alternativa, en algunos organismos fijadores de nitrógeno la oxidación de piruvato durante la respiración provoca la reducción de una proteína que se conoce como **flavodoxina**; después flavodoxina, $NADH$ o $NADPH$ reducen la ferredoxina o proteínas similares muy eficientes para reducir N_2 a NH_4^+ .

La nitrogenasa acepta electrones de flavodoxina, ferredoxina u otros agentes reductores eficaces mientras cataliza la fijación de nitrógeno. La nitrogenasa se compone de dos proteínas distintas, con frecuencia denominadas ferroproteína (Fe-proteína) y ferromolibdoproteína (Fe-Mo-proteína). La Fe-Mo-proteína posee dos átomos de molibdeno y 28 de hierro; la Fe-proteína contiene cuatro átomos de hierro en un grupo Fe_4S_4 . Tanto hierro como molibdeno se re-

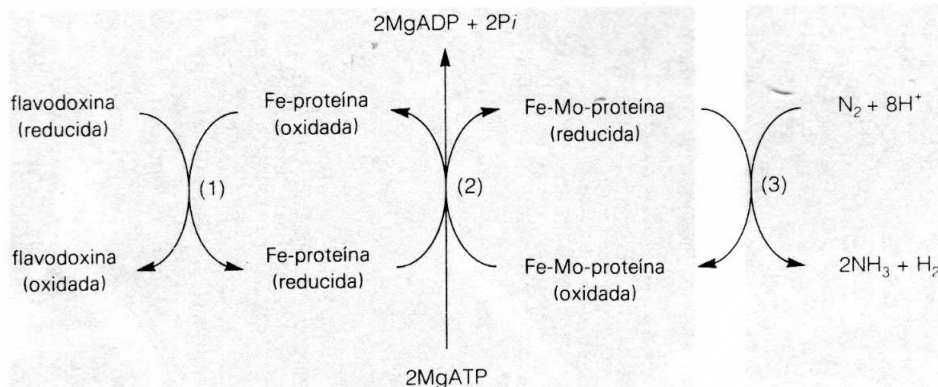


Figura 14-5 Resumen del transporte de electrones, desde flavodoxina reducida a N_2 y H^+ , en tres grandes pasos.

ducen y después se oxidan cuando la nitrogenasa acepta electrones de la ferredoxina y los transfiere al N_2 para formar NH_4^+ . El ATP es esencial para la fijación, debido a que se une a la ferroproteína y hace que ésta actúe como un agente reductor más fuerte. La Fe-proteína transfiere electrones a la Fe-Mo-proteína, simultáneamente con la hidrólisis de ATP a ADP. La Fe-Mo-proteína completa entonces la transferencia de electrones, al N_2 y a los protones, para formar dos NH_3 y un H_2 . En la Fig. 14-5 se resume el proceso del transporte de electrones (con la flavodoxina como donador de electrones) y utilización de ATP.

La fijación de nitrógeno es, como se mencionó antes, sensible al exceso de O_2 , porque tanto la Fe-proteína como la Fe-Mo-proteína de la nitrogenasa se desnaturalizan de manera oxidativa por acción del O_2 . La leghemoglobina controla en parte la disponibilidad de O_2 en el bacteroide, pero ciertas características anatómicas complejas del bacteroide en sí (como la corteza y endodermis que rodean todos los haces vasculares y células que contienen bacteroides) parecen ser mucho más importantes para mantener un nivel bajo de O_2 alrededor de la nitrogenasa al actuar como barrera a la difusión del aire en el suelo (Dakora y Atkins, 1989). Al parecer, la evolución de la relación simbiótica entre bacterias fijadoras de nitrógeno y raíces vegetales llevó al desarrollo de un excelente sistema de protección contra el oxígeno: el nódulo radical entero. En los organismos llamados de vida libre que fijan nitrógeno (bacterias y cianobacterias), las modificaciones bioquímicas parecen ser más importantes (Becana y Rodríguez-Barrueco, 1989).

El NH_3 (tal vez en forma de NH_4^+) se transloca fuera de los bacteroides antes de que pueda ser metabolizado por completo y utilizado por la planta hospedante. En el citosol de las células que contienen bacteroides (externas a la membrana peribacteroidea), el NH_4^+ se transforma en glutamina, ácido glutámico, asparagina y, en muchas especies, compuestos ricos en nitrógeno denominados **ureidos**. Los dos ureidos principales en leguminosas son *alantoína* ($C_4N_4H_6O_3$) y *ácido alantóico* ($C_4N_4H_8O_4$; véanse las estructuras en la Fig. 8-21); como la asparagina ($C_4N_2H_7O_4$), tienen proporciones

C:N relativamente elevadas. Cada uno de estos tres compuestos representa una de las formas principales en que el nitrógeno se transloca de los nódulos a otras partes de la planta. La asparagina predomina en leguminosas de origen templado, como chícharo, alfalfa, trébol y altramu. Los ureidos predominan en plantas de origen tropical como soya, caupí (*Vigna sinensis*) y varias especies de frijol (Schubert, 1986). En el aliso, una planta no leguminosa, otro ureido al que se conoce como citrulina (véase la Fig. 8-21) es el principal compuesto nitrogenado que se transporta desde los nódulos radiculares.

Los ureidos y la asparagina se desplazan de las células que contienen bacteroides a las células del periciclo adyacente a los haces vasculares que rodean al nódulo en sí. En muchas especies, estas células del periciclo se encuentran modificadas como células de transferencia (Secc. 8.3) que al parecer secretan activamente compuestos nitrogenados hacia las células de conducción en el xilema (Walsh *et al.*, 1989). De aquí, los compuestos se mueven por el xilema de la raíz y el tallo al que se conectan los haces vasculares del nódulo. Dichos compuestos se degradan (en gran parte en las hojas) para formar otra vez NH_4^+ , y el nitrógeno se incorpora rápidamente en aminoácidos, amidas y proteína (Winkler *et al.*, 1988). Las raíces de plantas noduladas que no se nodulan por sí mismas parecen recibir cantidades apreciables de nitrógeno sólo después de que éste ha pasado a las hojas y regresado por el floema junto con sacarosa. Hay, por tanto, un proceso cíclico: ascenso de nitrógeno por el xilema, de los nódulos a los brotes, y regreso del exceso de nitrógeno hacia las raíces, vía el floema.

Debido a la importancia de la fijación de nitrógeno, tanto en la naturaleza como en la agricultura, muchos especialistas en ecología, agronomía y fisiología vegetal han estudiado los factores genéticos y ambientales que la controlan. El elevado costo de los fertilizantes nitrogenados ha estimulado aún más la investigación en los últimos años. En general, se encuentra que los factores que favorecen la fotosíntesis, como son valores elevados de humedad, temperatura, luz del sol y niveles de CO_2 , estimulan la fijación de nitrógeno (Neves

y Hungría, 1987; Sheehy, 1987). En consistencia con esto, la tasa de fijación de nitrógeno es máxima hacia el mediodía, cuando la translocación de azúcares de las hojas a los nódulos se efectúa con rapidez. Las horas que preceden al atardecer también son momentos en que la respiración se realiza con especial rapidez, y la corriente de transpiración ayuda a eliminar compuestos nitrogenados de las raíces y nódulos radicales (Pate, 1980).

Diversos factores genéticos controlan las tasas de fijación de nitrógeno y la productividad de leguminosas. Uno de los factores tiene que ver con la efectividad con que ocurre la nodulación, lo que depende de procesos de reconocimiento, controlados genéticamente, entre las especies bacterianas y las especies o variedades de leguminosas. Los investigadores están realizando intentos por incrementar la eficiencia de la nodulación, modificando genes de diversos rizobios y seleccionando variedades de hospedantes más compatibles (Rolfe y Gresshoff, 1988; Martínez *et al.*, 1990). Otro factor genético se relaciona con la capacidad de la nitrogenasa de todos los organismos de reducir H^+ en competencia con N_2 . Como muestra la Reacción 14.1, una cuarta parte de los electrones disponibles gracias a la reducción del N_2 se utilizan para reducir H^+ a H_2 , el cual escapa a la atmósfera del suelo, llevándose consigo energía desperdiciada. De cualquier forma, la mayoría de las especies de *Rhizobium*, así como otras estrechamente relacionadas y bacterias de vida libre, contienen una **hidrogenasa** que oxida gran parte del H_2 a H_2O antes de que escape. Durante esta oxidación se produce ATP a partir de ADP y P_i . Hay evidencia de que la soya y algunas otras leguminosas que contienen cepas de *Rhizobium* con una hidrogenasa activa presentan rendimientos ligeramente mayores que los de leguminosas que contienen un mutante sin hidrogenasa, tal vez debido a que se desperdicia menos energía (Eisbrenner y Evans, 1983; Neves y Hungría, 1987; Stam *et al.*, 1987). Quizá mediante técnicas de ingeniería genética puedan hallarse o desarrollarse especies o cepas de *Rhizobium* con hidrogenasas activas y que sean aún más eficaces para incrementar la productividad de las leguminosas. El objetivo de incorporar genes para la fijación de nitrógeno en raíces de especies no leguminosas por técnicas de ingeniería genética en la actualidad parece lejano, en parte debido a que los genes implicados en la fijación de nitrógeno y su control son muy numerosos. Sin embargo, se está logrando un progreso considerable en este campo.

El estadio de crecimiento también influye en la fijación de nitrógeno. Tres leguminosas importantes —soya, chícharo y cacahuate— presentan tasas de fijación máximas después de la floración, cuando aumenta la demanda de nitrógeno en semillas y frutos en desarrollo. Estas especies, como es común en leguminosas, tienen semillas muy ricas en proteínas. De hecho, las semillas de soya contienen 40% de proteína, el porcen-

taje más elevado que se conoce para cualquier planta. Cerca del 90% de la fijación de nitrógeno en estas especies se efectúa durante el periodo de desarrollo reproductivo, y como el 10% durante los dos primeros meses de crecimiento vegetativo.

De manera sorprendente, la fijación de nitrógeno sólo proporciona alrededor del 25 al 50% del nitrógeno total en varios granos de leguminosas maduros cultivados en suelos con fertilidad normal; el restante 50 a 75% se absorbe del suelo en forma de NO_3^- o NH_4^+ , en mayor medida durante el periodo de crecimiento vegetativo. Por otra parte, no suele ser posible incrementar la productividad de los granos de leguminosas con fertilizantes nitrogenados, ya que la fijación de nitrógeno disminuye con el incremento de la cantidad de nitrógeno que se absorbe como fertilizante. En el caso de los fertilizantes que contienen nitratos, este decremento se debe a inhibición de la unión del rizobio a los pelos radicales, aborto de filamentos de infección, lentitud de crecimiento del nódulo, inhibición de la fijación en nódulos ya establecidos y senescencia más rápida de los nódulos cuando se agrega NO_3^- o NH_4^+ (Robertson y Farnden, 1980; Streeter, 1988).

La cantidad de N_2 fijada por especies perennes de leguminosas nativas y cultivadas en diversos momentos de la temporada de crecimiento probablemente es máxima durante el desarrollo reproductivo. El porcentaje de nitrógeno que se deriva del N_2 fijado en tales especies tal vez sea mayor que en leguminosas anuales como chícharo, frijol y soya, debido a que los nódulos son perennes y la fijación debe empezar antes que en las anuales, en las que el desarrollo nodular debe empezar de nuevo cada año. Además, las plantas nativas que fijan nitrógeno muchas veces crecen en suelos relativamente infértiles en los que la principal entrada de nitrógeno es por fijación. Para campos de alfalfa perennes, en los que cada cultivo se retira tan pronto como florece, la principal fuente de nitrógeno es la fijación (Vance y Heichel, 1981).

14.3 Asimilación de Nitrato y Iones Amonio

Para plantas que no pueden fijar N_2 , las únicas fuentes importantes de nitrógeno son NO_3^- y NH_4^+ . En general, esto es válido para todas las plantas cultivadas, excepto leguminosas (sin embargo véase el Ensayo 14.1). Las plantas cultivadas y muchas especies nativas absorben la mayor parte del nitrógeno en forma de NO_3^- , debido a que el NH_4^+ es oxidado a NO_3^- con mucha rapidez por bacterias nitrificantes. Sin embargo, comunidades clímax de coníferas y pastos absorben casi todo el nitrógeno en forma de NH_4^+ debido a que la nitrificación es inhibida por un pH bajo del suelo o por taninos y compuestos fenólicos (Rice, 1974; Haynes y

Goh, 1978). Runge (1983) y Bloom (1988) revisan la importancia de NO_3^- y NH_4^+ para varias especies en diversas condiciones ambientales. Primero se estudiará la asimilación de nitrato, por su abundancia en la mayoría de los suelos y debido a que debe transformarse en NH_4^+ en la planta antes de que el nitrógeno forme parte de aminoácidos u otros compuestos nitrogenados.

Sitios de Asimilación de Nitrato

Tanto raíces como partes aéreas requieren compuestos nitrogenados, pero, ¿en cuál de estos órganos se reduce el NO_3^- y se incorpora a compuestos orgánicos? Las raíces de algunas especies pueden sintetizar todo el nitrógeno que necesitan a partir de NO_3^- , mientras que las raíces de otras especies dependen de las partes aéreas para obtener nitrógeno orgánico. La evidencia de este hecho proviene de dos tipos de estudios. En uno, se permite que las plantas absorban NO_3^- , después de lo cual se hieren sus tallos para colectar y analizar la savia del xilema, con objeto de ver si contiene NO_3^- o compuestos de nitrógeno reducido. En el segundo tipo, se compara la actividad de la nitrato reductasa en raíces y partes aéreas (en especial hojas). En cada caso, la suposición razonable es que la mayor parte de la reducción de NO_3^- ocurre en el sitio (raíz o parte aérea) donde se presenta el grueso de la actividad de la nitrato reductasa. Cada uno de estos estudios presenta problemas, pero cuando coinciden, nos inclinamos a creer que los resultados reflejan lo que ocurre en la naturaleza. Andrews (1986) resume los resultados para más de 30 especies y describe algunos de los factores que influyen en el sitio donde se reduce el nitrato (véase también Van Beusichem *et al.*, 1987).

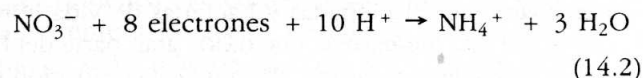
En la Fig. 14-7 se muestran los resultados de un estudio en el que se analizaron sustancias nitrogenadas en la corriente de transporte del xilema de varias especies herbáceas durante el crecimiento vegetativo; las plantas tenían las raíces en arena humedecida con una solución nutritiva a base de nitrato. (Las leguminosas carecían de nódulos radicuales.) Ninguna de estas plantas translocó cantidades detectables de NH_4^+ a las partes aéreas, pero algunas realizaron el transporte de grandes cantidades de nitrógeno orgánico derivado de NH_4^+ , en especial aminoácidos y amidas. El abrojo (*Xanthium strumarium*) y el altrámu (*Lupinus albus*) representan extremos entre las especies de este estudio. Las raíces del abrojo casi no reducen NO_3^- por lo que al parecer dependen de aminoácidos translocados en el floema desde las hojas. En el altrámu, casi todo el NO_3^- se absorbió y transformó en aminoácidos y amidas en las raíces. Otros investigadores han obtenido resultados similares con estas dos especies (Andrews, 1986). La mayoría de las coníferas y los árboles deciduos estudiados se comportan como el altrámu y translocan poco NO_3^- a las partes aéreas, usualmente

provistas en estas especies de una dieta de nitrógeno orgánico. Se necesita mucho más investigación en plantas de diferentes edades y en coníferas, otros árboles de bosque y plantas herbáceas en estado silvestre, casos en los cuales las hifas de las micorrizas pueden aportar compuestos orgánicos a las células de la raíz. Además, los tipos de compuestos que se transportan a las partes aéreas de leguminosas se modifican cuando hay nódulos radicuales y cuando se fija nitrógeno en asparagina y ureidos (Winkler *et al.*, 1988; Pate, 1989). Queda mucho por aprender acerca de lo que en realidad ocurre en la naturaleza.

Las cantidades relativas de NO_3^- y nitrógeno orgánico en el xilema dependen de las condiciones ambientales. Incluso plantas que por lo común no translocan mucho NO_3^- lo hacen si se proporcionan al suelo grandes cantidades de este ion, o si las raíces se encuentran frías (Andrews, 1986). En estas condiciones, la reducción de NO_3^- en raíces no puede seguir el paso al transporte hacia las partes aéreas. Por tanto, hay reducción en hojas y tallos, en especial durante días soleados.

Proceso de la Reducción de Nitrato

El proceso global de la reducción de NO_3^- a NH_4^+ es dependiente de energía y se resume en la Reacción 14.2:



El número de oxidación del nitrógeno cambia de +5 a -3.

En breve se describirá el origen de los ocho electrones (y 10 H^+) que se necesitan para este proceso de reducción, pero nótese que en la reacción se utilizan dos H^+ más que electrones. Este uso de H^+ hace que el pH de la célula aumente. El continuo incremento de pH podría resultar letal para las plantas si éstas no tuviesen forma de reemplazar dichos iones H^+ (Raven y Smith, 1976; Raven, 1988). Alrededor de la mitad se neutralizan cuando el NH_4^+ subsecuentemente se convierte en proteína, ya que este proceso libera un H^+ por cada átomo de nitrógeno implicado. La neutralización de la otra mitad se efectúa por diversos mecanismos (Raven, 1988). En algas, angiospermas acuáticas y raíces, los iones H^+ se absorben del medio circundante o se excretan iones OH^- al medio, lo que ayuda a mantener constante el pH celular. En partes aéreas, el reemplazo de iones H^+ se efectúa mediante la producción de ácido málico y otros ácidos derivados de azúcares o almidón. Esto es parte de un mecanismo estabilizador del pH ("*pH stat*") que actúa debido a que la PEP carboxilasa fija de manera mucho más eficaz PEP y HCO_3^- en ácido oxalacético, el precursor del ácido málico, a medida que sube el pH. También se piensa

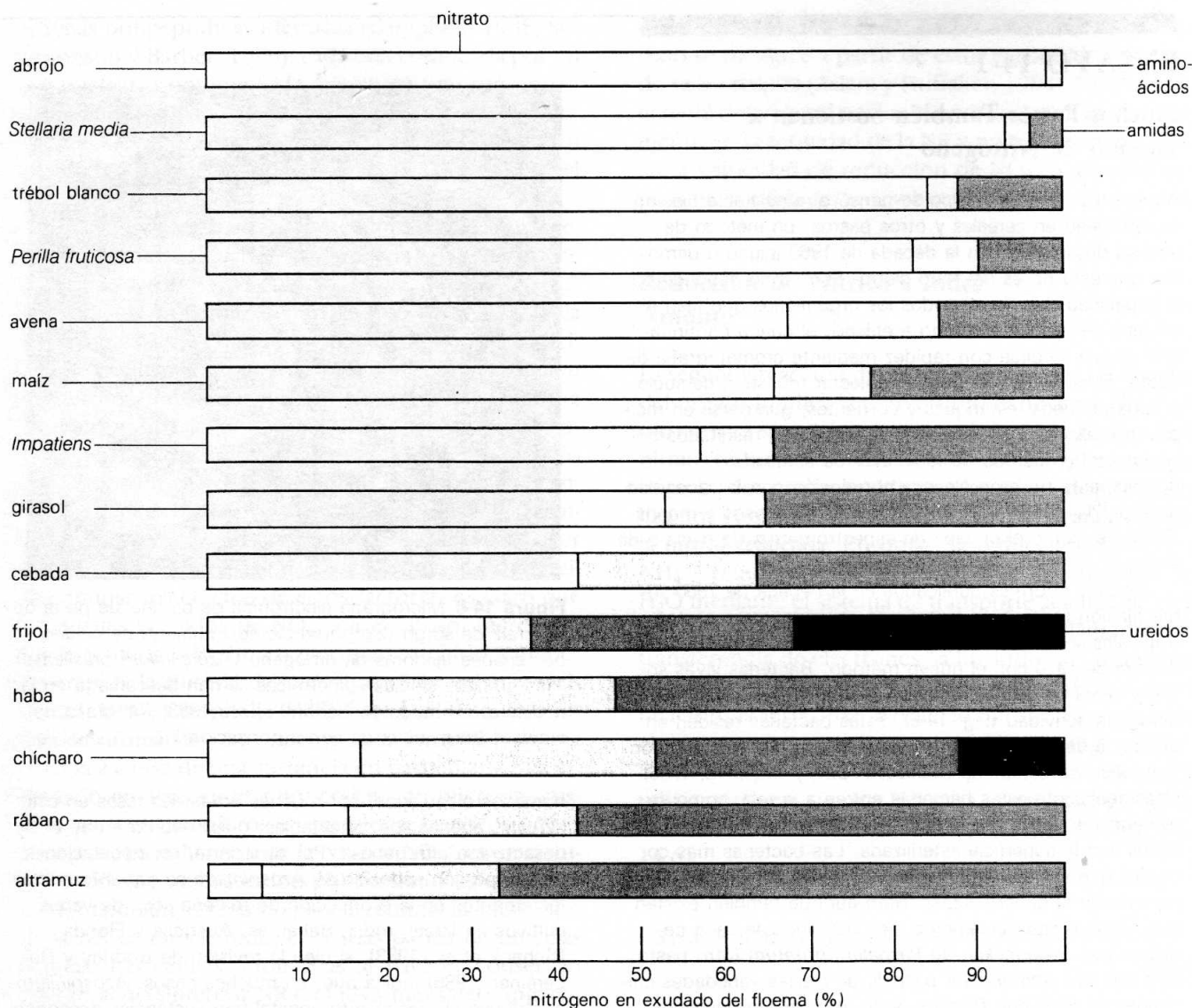
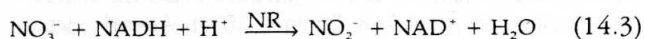


Figura 14-7 Cantidades relativas de compuestos nitrogenados en la savia del xilema de varias especies. Las plantas se cultivaron con las raíces en arena estéril humedecida con una solución nutritiva estéril, la cual contenía 140 mg/L de nitrógeno en forma de nitrato (10 mM NO_3^-); después se cortaron los tallos para coleccionar la savia del xilema. Las especies de la porción superior de la figura transportan sobre todo nitrato; las de la porción inferior, sobre todo amidas y aminoácidos. Dos leguminosas también transportan ureidos, en especial citrulina. (Tomado de Pate, 1973.)

que parte de los aniones malato que se producen durante el proceso de neutralización se transportan por el floema, en forma de sales de K^+ , de regreso a las raíces. Este transporte impide que el potencial osmótico se torne demasiado negativo cuando se acumulan sales de ácidos orgánicos en las células de las partes aéreas. En raíces, el malato que se transporta se descarboxila a piruvato y CO_2 , mientras que el K^+ se recircula con NO_3^- y otros aniones de vuelta a las partes aéreas a través del xilema.

La reducción del nitrato se efectúa en dos reacciones distintas catalizadas por enzimas diferentes. La pri-

mera reacción es catalizada por la **nitrato reductasa (NR)**, una enzima que transfiere dos electrones procedentes del NADH o, en unas pocas especies, del NADPH. Los productos son nitrito (NO_2^-), NAD^+ (o NADP^+) y H_2O :



Esta reacción se efectúa en el citosol, fuera de cualquier organelo. La NR se compone de dos subunidades de

cadenas polipeptídicas idénticas (Campbell, 1988; Solomonson y Barber, 1990), cada una codificada por un gen nuclear. Contiene FAD, hierro en un grupo prostético hem y molibdeno, todo lo cual se oxida y reduce de manera consecutiva a medida que se transportan los electrones del NADH al átomo de nitrógeno en el NO_3^- .

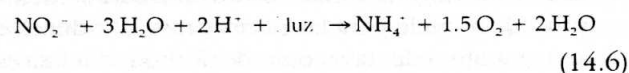
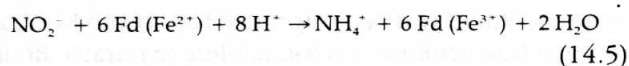
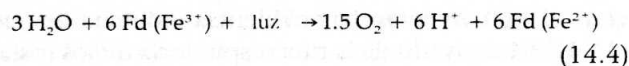
La NR se ha estudiado intensivamente debido a que, con frecuencia, su actividad controla la velocidad de la síntesis de proteínas en plantas que absorben NO_3^- como fuente principal de nitrógeno. La actividad de la NR es afectada por diversos factores. Uno es la velocidad de su síntesis y otro es la tasa de su degradación por enzimas que digieren proteínas (proteinasas, que se describen en la Secc. 14.5). Al parecer, la NR se sintetiza y degrada continuamente, de manera que estos procesos controlan la actividad de la enzima regulando la cantidad de NR en las células. Dicha actividad también es afectada tanto por inhibidores como por activadores en el interior de la célula. Aunque es difícil discriminar los efectos de estos factores, es claro que los niveles elevados de NO_3^- en el citosol incrementan la actividad de NR, en gran parte debido a que es más rápida la síntesis de la enzima (Rajasekhar y Oelmüller, 1987; Campbell, 1988). Éste es el caso de la **inducción enzimática** —incremento en la formación de una enzima a causa de una sustancia en particular—. La inducción enzimática es muy común en microorganismos, pero en mamíferos o vegetales se conocen pocos ejemplos. La inducción de la NR por NO_3^- es un ejemplo excelente de inducción por sustrato, ya que el inductor también es sustrato para la enzima. La inducción de la NR es muy común en varias partes de diversas plantas. Las células implicadas al parecer conservan energía al no sintetizar NR o el RNA mensajero que codifica dicha enzima sino hasta que se dispone de NO_3^- ; es entonces cuando la enzima empieza a aparecer en cuestión de unas pocas horas. Está investigándose la manera en que el NO_3^- activa al gen que se necesita para la formación de NR.

En hojas y tallos, la luz también incrementa la actividad de la NR cuando el NO_3^- está disponible. Por consiguiente, es común la existencia de un ritmo diurno (día-noche) en la actividad de la NR. La manera en que la luz causa este ritmo aún resulta poco clara y parece variar con la planta y el estadio de su desarrollo. En primer lugar, en tejidos verdes, la luz activa uno o ambos fotosistemas de la fotosíntesis. Esto incrementa (quizá mediante suministro de ATP) el transporte de NO_3^- almacenado de la vacuola al citosol, donde se efectúa entonces la inducción de la NR (Granstedt y Huffaker, 1982). En segundo lugar, la luz activa el sistema del fitocromo (Cap. 20), lo que de alguna manera activa al gen que codifica el RNAm que a su vez codifica la NR (Rajasekhar *et al.*, 1988). Por último, a través de la fotosíntesis, la luz promueve la actividad de la NR porque incrementa el aporte de carbohidrato, mientras

que el NADH que se necesita para la reducción de nitrato se produce a partir de estos carbohidratos cuando se les respira (Aslam y Huffaker, 1984). La respuesta general del vegetal a estos efectos de la luz es un incremento en la actividad de la NR y un mayor incremento en la velocidad de reducción de NO_3^- a amonio después de la salida del Sol, sobre todo en las partes aéreas.

Reducción de Nitrito a Iones Amonio

La segunda reacción del proceso global de la reducción del nitrato implica la conversión de nitrito a NH_4^+ . El nitrito que se origina en el citosol por la acción de la nitrato reductasa se transporta a los cloroplastos en las hojas o a los protoplastidios en las raíces, donde se realiza una subsecuente reducción a NH_4^+ , catalizada por la **nitrito reductasa**. En hojas, la reducción de NO_2^- a NH_4^+ requiere seis electrones que se obtienen del H_2O mediante el sistema de transporte acíclico de electrones del cloroplasto (Reacción 14.4). Durante esta transferencia de electrones, la luz induce el transporte de electrones del H_2O a la ferredoxina (Fd); a continuación, la ferredoxina reducida proporciona los seis electrones que se utilizan para reducir NO_2^- a NH_4^+ . Es en este paso (Reacción 14.5), cuando se efectúa la utilización neta de dos H^+ para el proceso global de la reducción de nitrato a NH_4^+ (véase la Reacción 14.6).



Las Reacciones 14.4 y 14.6 indican que se requieren tres moléculas de H_2O para proporcionar los seis electrones que se necesitan en la ferredoxina reducida (dos electrones por cada H_2O escindido por la energía luminosa), aun cuando también aparecen dos H_2O como productos de esta reacción global.

Si bien la ferredoxina reducida es el donador normal de electrones para la nitrito reductasa en hojas, la sustancia reductora en raíces aún no se conoce con certeza. Cuando se estudia *in vivo* la nitrito reductasa, ésta acepta poco los electrones provenientes de NADH, NADPH o de compuestos de flavina que se presentan de forma natural, como FADH_2 . La ferredoxina reducida proporcionará electrones para las nitrito reductasas aisladas en las raíces, pero ni los proplastidios ni

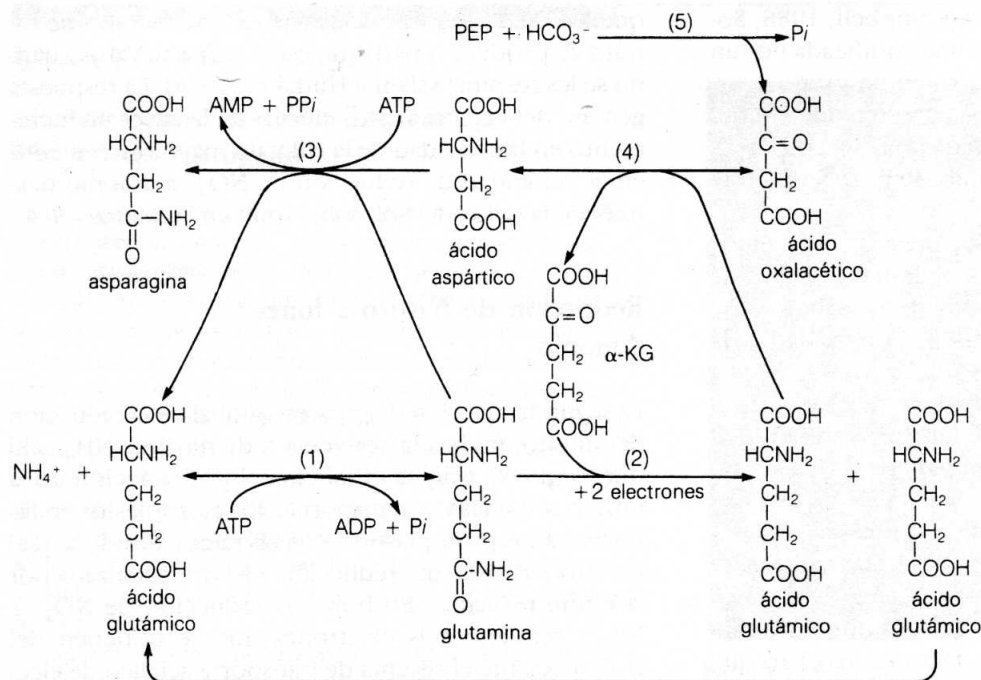


Figura 14-8 Conversión de amonio (abajo a la izquierda) en compuestos orgánicos importantes.

otras partes de las células radicales contienen cantidades detectables de ferredoxina. Aunque aún no se tiene seguridad sobre la manera en que las raíces reducen NO_2^- a NH_4^+ , resulta claro que se necesita un aporte de carbohidratos de las hojas y que la mayoría de las reducciones se efectúan en los proplastidios (Bowsher *et al.*, 1989). Además, hay evidencia indirecta de que el NADPH derivado de la ruta respiratoria de los fosfatos de pentosa es la sustancia reductora activa. Resulta sorprendente el que la nitrito reductasa, como la nitrato reductasa, también sea inducible por nitrato. En la cebada, la adición de nitrato o nitrito a una solución nutritiva disponible para las raíces causa la inducción tanto de nitrato reductasa como de nitrito reductasa en hojas (Aslam y Huffaker, 1989). Sin embargo, los experimentos indican que el ion activo es el nitrato y que, para ser funcional, el nitrito primero tiene que oxidarse a nitrato.

Conversión de Amonio en Compuestos Orgánicos

Ya sea que el NH_4^+ se absorba directamente del suelo, o que se produzca por reducción de NO_3^- o por fijación de nitrógeno dependiente de energía, no se acumula en ningún sitio del vegetal. El amonio es, de hecho, muy tóxico (Givan, 1979), quizá debido a que inhibe la formación de ATP en cloroplastos y mitocondrias al actuar como agente desacoplante. Ex-

cepto por trazas de NH_4^+ que escapan a la atmósfera como NH_3^- volátil (véanse la Fig. 14-1 y Farquhar *et al.*, 1980), parece que todo el NH_4^+ primero se convierte en el grupo amida de la glutamina. Esta conversión junto con otras reacciones da por resultado ácido glutámico, ácido aspártico y asparagina, como se resume en la Fig. 14-8 y se describe brevemente a continuación.

La glutamina se forma por adición de un grupo NH_2 proveniente del NH_4^+ al grupo carboxilo más alejado del carbono alfa del ácido glutámico. De esta manera se forma un enlace amida (Fig. 14-8, reacción 1), y la glutamina es una de dos amidas vegetales de especial importancia (véanse las estructuras en la Fig. 9-2). La enzima necesaria en este caso es la *glutamina sintetasa*. La hidrólisis de ATP a ADP y P_i es esencial para hacer que continúe la reacción. Debido a que esta reacción necesita ácido glutámico como reactivo, debe haber algún mecanismo que lo proporcione; esto se consigue mediante la reacción 2, que es catalizada por la *glutamato sintasa*. Esta enzima transfiere el grupo amida de la glutamina al carbono carbonílico del ácido α -cetoglutarico, por lo que se forman dos moléculas de ácido glutámico. Este proceso requiere un agente reductor capaz de donar dos electrones: ferredoxina (dos moléculas) en los cloroplastos y NADH o NADPH en proplastidios de células no fotosintéticas. Uno de los dos glutamatos que se forman en la reacción 2 es fundamental para mantener la reacción 1, pero el otro puede convertirse directamente en proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, etc. Además, parte del glutamato